

03500,016239



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
TAKESHI IMAMURA ET AL.) Examiner: Unassigned
Application No.: 10/084,172) Group Art Unit: Unassigned
Filed: February 28, 2002)
For: NOVEL POLYHYDROXYALKANOATE)
CONTAINING UNIT WITH PHENYL-)
SULFANYL STRUCTURE IN THE SIDE)
CHAIN, PROCESS FOR ITS PRO-)
DUCTION, CHARGE CONTROL)
AGENT, TONER BINDER AND TONER)
WHICH CONTAIN NOVEL POLY-)
HYDROXYALKANOATE, AND IMAGE-)
FORMING METHOD AND IMAGE-)
FORMING APPARATUS WHICH MAKE)
USE OF THE TONER) May 14, 2002

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claim priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese Priority Applications:

- 1) 2001-057142, filed March 1, 2001
- 2) 2001-057145, filed March 1, 2001
- 3) 2001-164774, filed May 31, 2001
- 4) 2001-210037, filed July 10, 2001
- 5) 2001-210049, filed July 10, 2001
- 6) 2002-039254, filed February 15, 2002

A certified copy of each of the priority document is enclosed.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,

Peter Saxon

Attorney for Applicants

Registration No. 24947

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY MAIN 260331v1



本 国 特 許 厅
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2 0 0 1 年 3 月 1 日

出 願 番 号

Application Number:

特願 2 0 0 1 - 0 5 7 1 4 2

[ST.10/C]:

[J P 2 0 0 1 - 0 5 7 1 4 2]

出 願 人

Applicant(s):

キヤノン株式会社

2 0 0 2 年 3 月 2 2 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特 2 0 0 2 - 3 0 1 9 1 7 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 4354005

【提出日】 平成13年 3月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/62

【発明の名称】 側鎖にチオフェノキシ構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、およびその製造方法

【請求項の数】 24

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 今村 剛士

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 須川 悅子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 見目 敬

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 本間 務

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 矢野 哲哉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 鈴木 智博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 野本 肇

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【ブルーフの要否】 要

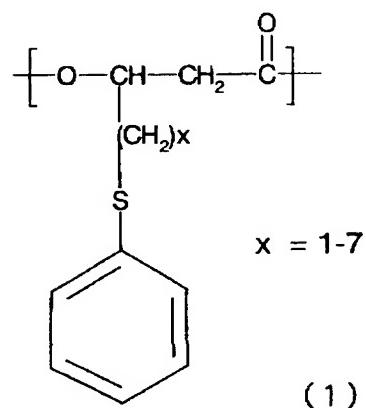
【書類名】 明細書

【発明の名称】 側鎖にチオフェノキシ構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、およびその製造方法

【特許請求の範囲】

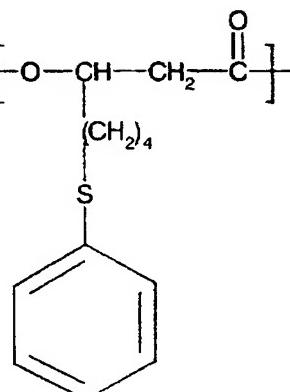
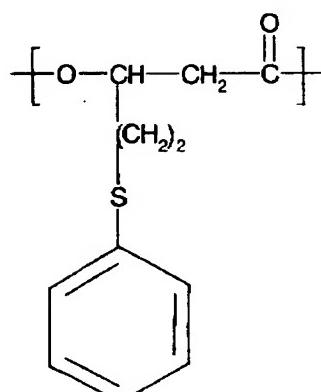
【請求項 1】 化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート(但し化学式(2)及び化学式(3)に示す 2 つのユニットが分子鎖中に同時に存在し、かつこれら 2 つのユニットのみからなるポリヒドロキシアルカノエートを除く)。

【化 1】



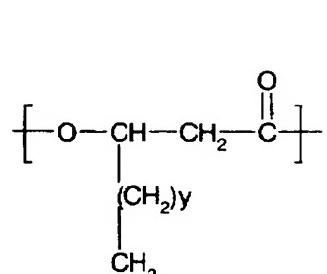
\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

〔化2〕

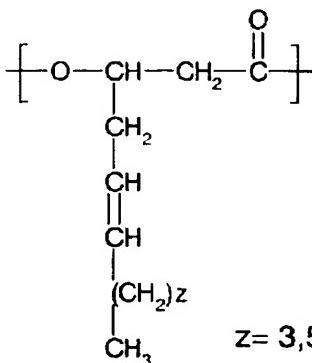


【請求項2】 化学式(1)に示されるユニット以外及び、化学式(4)及び(5)に示されるユニットの少なくとも一方を含む、ポリヒドロキシアルカノエート。

【化3】



$y = 0-8$



$z = 3,5$

(4)

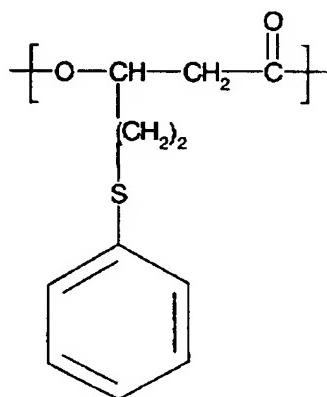
(5)

y 及び z はそれぞれ独立して化学式中に示した範囲内で
任意の一つ以上の整数値をとり得る。

【請求項3】 数平均分子量が10000から300000の範囲である請求項1及び2のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項4】 化学式(2)に示す、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸ユニットを含む請求項1から3のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化4】

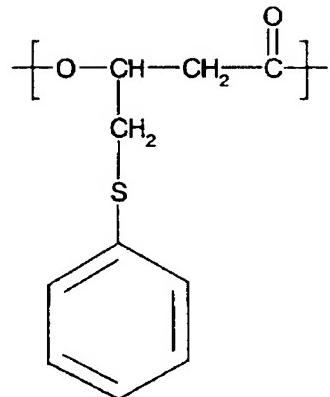


(2)

【請求項5】 化学式(6)に示す、3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸

ユニットを含む請求項1から4のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化5】

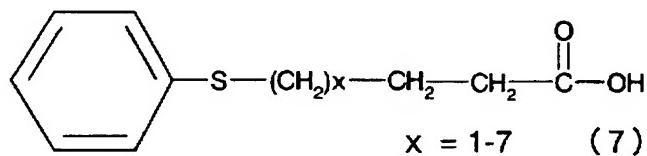


(6)

【請求項6】 3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸以外のモノマーユニットが、3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸のうち、一つ以上のモノマーユニットを含む請求項5に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

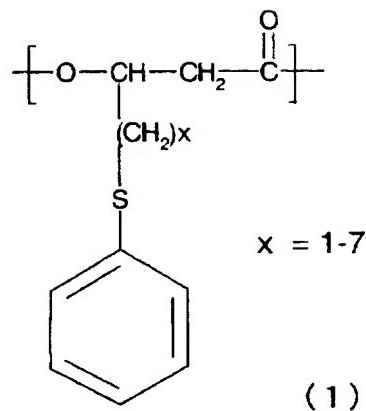
【請求項7】 化学式(7)で示される化合物を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート(但し化学式(2)及び化学式(3)に示す2つのユニットのみからなるポリヒドロキシアルカノエートを除く)の製造方法。

【化6】



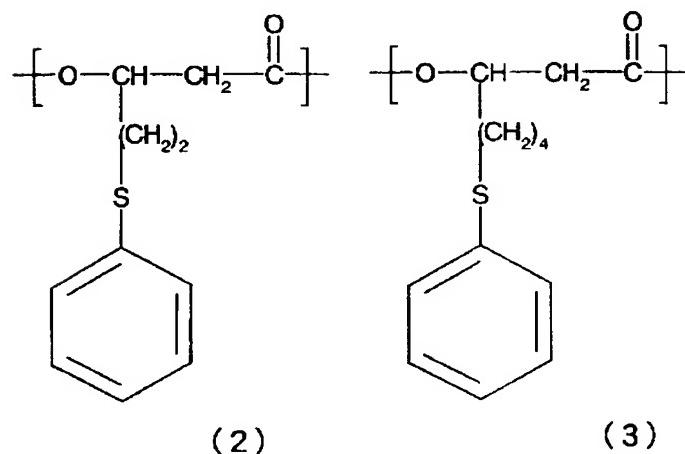
x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

【化 7】



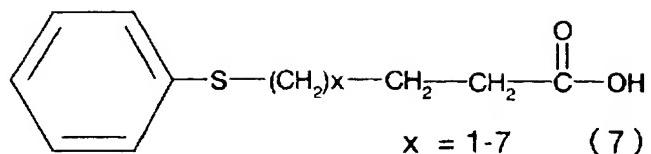
×は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

【化 8】



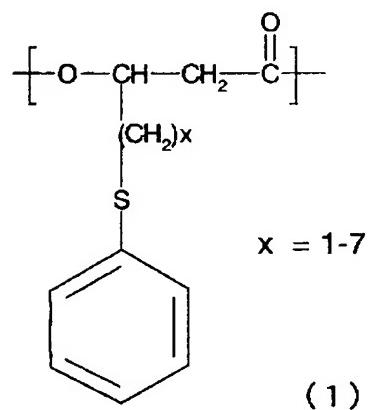
【請求項 8】 化学式(7)で示される化合物及びポリペプトンを含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化9】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

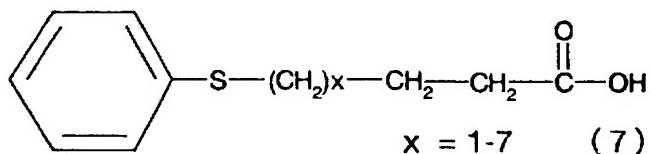
【化10】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

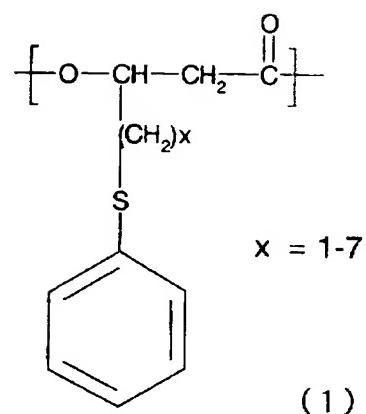
【請求項9】 化学式(7)で示される化合物及び酵母エキスを含む培地中で
微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒド
ロキシアルカノエートの製造方法。

【化11】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

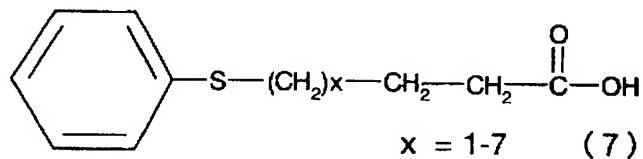
【化12】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

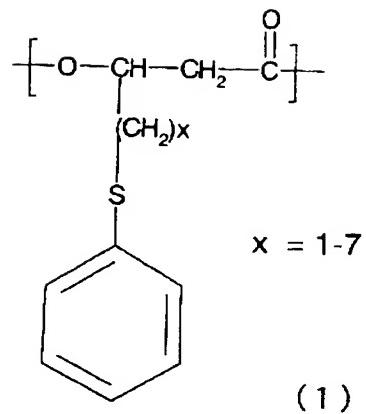
【請求項10】 化学式(7)で示される化合物及び糖類を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化13】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

【化14】

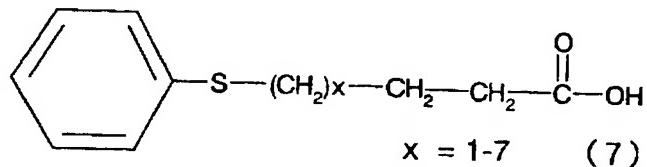


×は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

【請求項11】 該糖類がグリセロアルデヒド、エリスロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリスリトール、キシリトール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクツロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースから選ばれる1つ以上の化合物である請求項10に記載の方法。

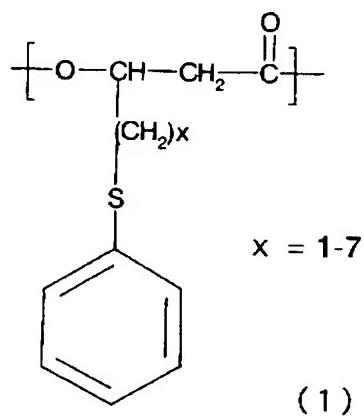
【請求項12】 化学式(7)で示される化合物、及び有機酸或いはその塩を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化15】



×は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

【化16】

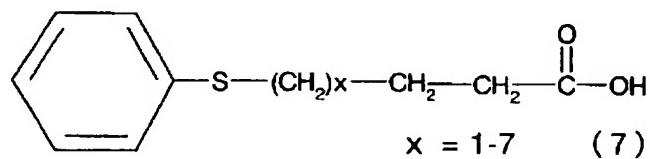


\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

【請求項13】 該有機酸或いはその塩がピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物である請求項12に記載の方法。

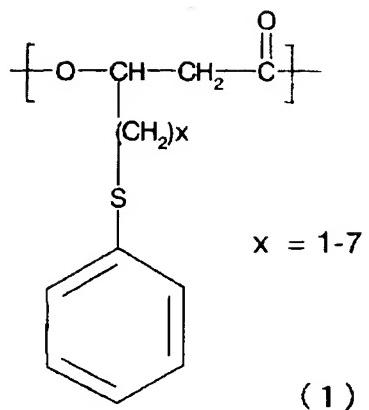
【請求項14】 化学式(7)で示される化合物、及びアミノ酸或いはその塩を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化17】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

【化18】

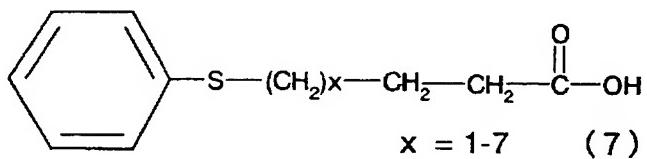


x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

【請求項15】 該アミノ酸或いはその塩がグルタミン酸、アスパラギン酸
、或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物である請求項14に記載の方法。

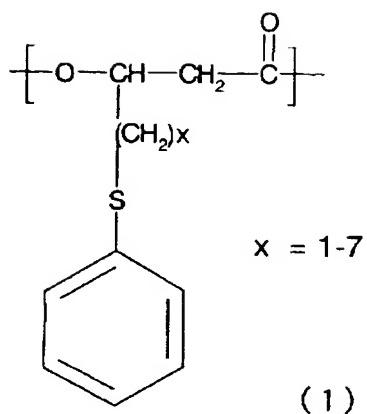
【請求項16】 化学式(7)で示される化合物、及び炭素数4から12の直
鎖アルカン酸或いはその塩を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、
化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化19】



x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

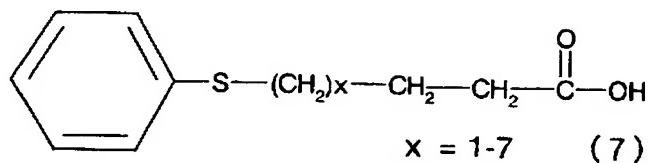
【化20】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

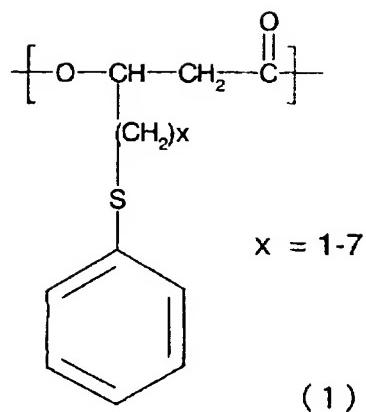
【請求項17】 化学式(7)で示される化合物、及びポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物と有機酸或いはその塩とを含む培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化21】



\times は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

【化22】

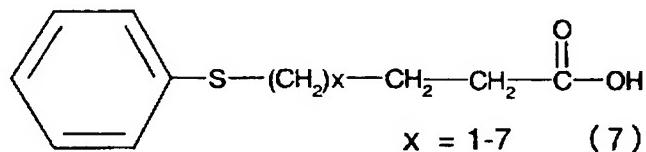


x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

【請求項18】 該有機酸或いはその塩がピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物である請求項17に記載の方法。

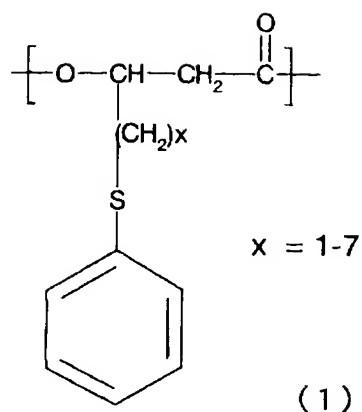
【請求項19】 化学式(7)で示される化合物、及びグルコースを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物とグルコースとを含む窒素源を含まない培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なうことの特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化23】



x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

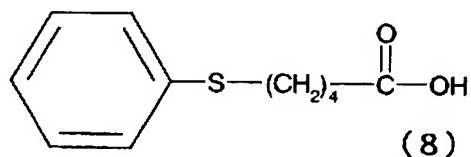
【化24】



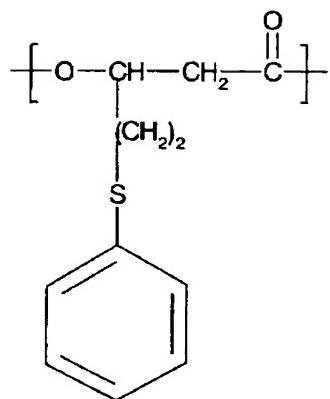
x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

【請求項20】 化学式(8)で示される5-チオフェノキシ吉草酸を含む培地の中で微生物を培養し、化学式(2)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-チオフェノキシ)吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産することを特徴とする、請求項4から19のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化25】



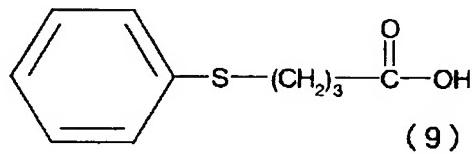
【化26】



(2)

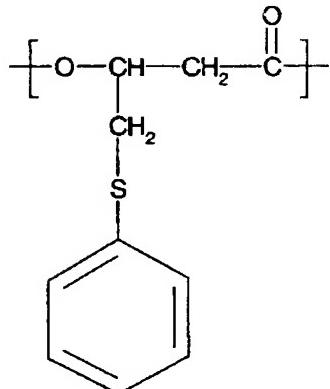
【請求項21】 化学式(9)で示される4-チオフェノキシ酪酸を含む培地
中で微生物を培養し、化学式(6)で示される3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ
酪酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産することを特徴とする
、請求項4から20のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方
法。

【化27】



(9)

【化28】



(6)

【請求項22】 該微生物細胞からポリヒドロキシアルカノエートを回収する工程を含む請求項4から21のいずれかに記載の方法。

【請求項23】 該微生物がシュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物である請求項4から22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】 該微生物がシュードモナス・チコリアイ YN2株(*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス・チコリアイ H45株(*Pseudomonas cichorii* H45, FERM BP-7374)、シュードモナス・ジェッセニイ P161株(*Pseudomonas jessenii* P161, FERM BP-7376)のいずれかが1つ以上の株である、請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規なポリヒドロキシアルカノエートの一種であるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)に関する。また当該PHAを生産し体内に蓄積する微生物を用いた当該PHAの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまで、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ酪酸(PHB)あるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されてきた(「生分解性プラスチックハンドブック」,生分解性プラスチック研究会編,(株)エヌ・ティー・エス,P178-197(1995))。これらのポリマーは従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全分解されるという利点を有しており、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】

このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、

培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、このような組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0004】

[1] まず、3-ヒドロキシ酪酸(以下、3HBと略す)をはじめとする比較的簡単な構造のモノマーユニットを重合させたPHAの生合成としては、次のものが挙げられる。

【0005】

(a) 3HBと3-ヒドロキシ吉草酸(以下3HV)を含むもの

特表平6-15604号公報、特表平7-14352号公報、特表平8-19227号公報等；特開平5-74492号公報

(b) 3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸(以下3HHx)を含むもの

特開平5-93049号公報、及び特開平7-265065号公報

(c) 3HBと4-ヒドロキシ酪酸(以下4HB)を含むもの

特開平9-191893号公報

(d) 炭素数6から12までの3-ヒドロキシアルカノエートを含むもの

特許公報第2642937号

(e) 単一の脂肪酸を炭素源とした生合成。生産物は(d)とほぼ同様

Appl. Environ. Microbiol., 58 (2), 746 (1992)

等が挙げられる。これらはいずれも微生物による炭化水素等の β 酸化や糖からの脂肪酸合成により合成された、いずれも側鎖にアルキル基を有するモノマーユニットからなるPHA、即ち、「usual PHA」である。

【0006】

[2] しかし、このような微生物産生PHAのより広範囲な応用、例えば機能性ポリマーとしての応用を考慮した場合、アルキル基以外の置換基を側鎖に導入したPHA「unusual PHA」が極めて有用であることが期待される。置換基の例としては、芳香環を含むもの(フェニル基、フェノキシ基、ベンゾイル基など)や、不飽和炭化水素、エステル基、アリル基、シアノ基、ハロゲン化炭化水素、エポキシドなどが挙げられる。これらの中でも、特に、芳香環を有するPHAの研

究が盛んになされている。

【0007】

(a) フェニル基もしくはその部分置換体を含むもの

Makromol. Chem., 191, 1957-1965(1990)及び*Macromolecules*, 24, 5256-5260(1991)には、5-フェニル吉草酸を基質として、シードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)が3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0008】

Macromolecules, 29, 1762-1766(1996)には、5-(4'-トリル)吉草酸を基質として、シードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)が3-ヒドロキシ-5-(4'-トリル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0009】

Macromolecules, 32, 2889-2895(1999)には、5-(2',4'-ジニトロフェニル)吉草酸を基質として、シードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)が3-ヒドロキシ-5-(2',4'-ジニトロフェニル)吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4'-ニトロフェニル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0010】

(b) フェノキシ基もしくはその部分置換体を含むもの

Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672(1994)には、11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-9-フェノキシン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0011】

特許公報第2989175号には、3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットあるいは3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5(MFP)Pユニットあるいは3H5(DFP)Pユ

ニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されており、その効果として、置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、撥水性を与えることができるとしている。

【0012】

この様なフッ素基置換体以外に、シアノ基やニトロ基の置換体の研究もなされている。

【0013】

Can.J.Microbiol., 41, 32-43(1995)及び*Polymer International*, 39, 205-213(1996)には、シュードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)ATCC 29347 株及びシュードモナス プチダ(*Pseudomonas putida*)KT 2442 株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産が報告されている。

【0014】

これらの報告は側鎖がアルキル基である一般的なPHAとは異なり、いずれもPHAの側鎖に芳香環を有しており、それに由来する物性を有するポリマーを得る上で有益である。

【0015】

[3]また新たなカテゴリーとして、単に物性の変化に留まらず、側鎖に適当な官能基を有するPHAを生産し、その官能基を利用して新たな機能を生み出そうとする研究も行われている。

【0016】

例えば*Macromolecules*, 31, 1480-1486(1996)及び、*Journal of Polymer Science:Part A:Polymer Chemistry*, 36, 2381-2387(1998)などでは、側鎖の末端にビニル基を持つユニットを含むPHAを合成した後、酸化剤によりエ

ポキシ化し、側鎖末端に反応性の高いエポキシ基を含むP H Aを合成出来たと報告されている。

【0017】

またビニル基以外にも、高い反応性が期待されるチオエーテルを持つユニットを含むP H Aの合成例として、*Macromolecules*, 32, 8315-8318(1999)においては、シュードモナス プチダ(*Pseudomonas putida*)27N01株が11-チオフェノキシ吉草酸を基質とし、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-チオフェノキシヘプタン酸のP H Aコポリマーを生産することが報告されている。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】

これらのうち、3-ヒドロキシ-チオフェノキシアルカン酸ユニットを含むP H Aに注目した場合、チオエーテルの反応性の高さから、機能性P H Aを開発していく上で今後益々研究がなされていくものと予想される。しかし、この様な種類のP H Aに関しては上に挙げた1例の報告があるに過ぎない。更に上記の方法は、炭素鎖長が長いカルボン酸を原料とし、微生物中で2炭素づつ短縮していくβ酸化系を利用し、原料よりも炭素鎖の短い3-ヒドロキシアルカン酸をポリマーのユニットとして取り込ませているため、ポリマー構造の制御が困難であるという問題があった。

【0019】

本発明の目的は、新規な、側鎖にチオエーテル構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、およびその製造方法を提供することにある。

【0020】

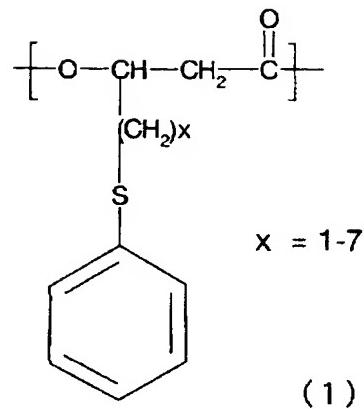
【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題を解決すべく銳意研究の結果、以下のような発明に至った。即ち、本発明の第一は、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート(但し化学式(2)及び化学式(3)に示す2つのユニットが分子鎖中に同時に存在し、かつこれら2つのユニットのみからなるポリヒドロキシアル

カノエートを除く)そのものである。

【0021】

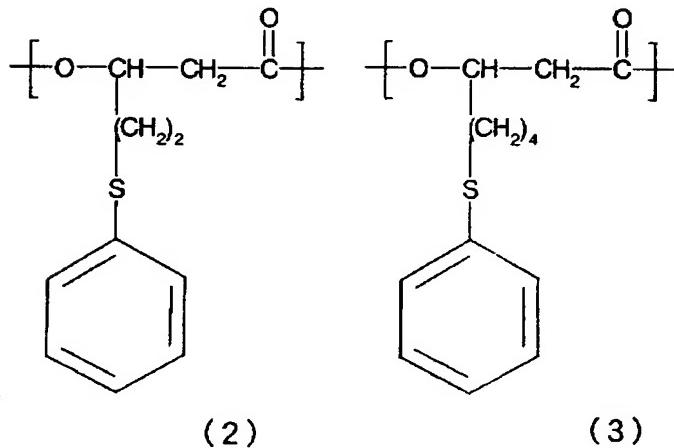
【化29】



x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の
整数値をとり得る

【0022】

【化30】



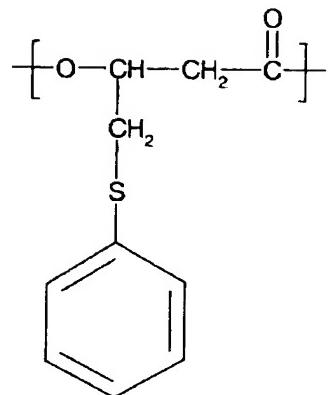
【0023】

特に、化学式(6)で表される3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸(以下、3HTPxBと略する場合もある)をモノマーユニットとして含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、及び化学式(2)で表される3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸(以下、3HTPxVと略する場合もある)をモノマーユニットとして

含む新規なポリヒドロキシアルカノエートである。

【0024】

【化31】



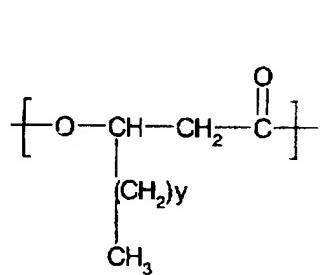
(6)

【0025】

本発明のポリヒドロキシアルカノエートは、化学式(1)に示されるユニット以外に、化学式(4)及び(5)に示されるユニットのいずれか、或いは両方共を含んでいてもよい。

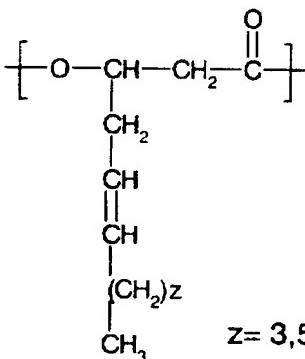
【0026】

【化32】



$$y = 0\text{--}8$$

(4)



$$z = 3\text{,}5$$

(5)

y 及び z はそれぞれ独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。

【0027】

y 及び z はそれぞれ独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。

【0028】

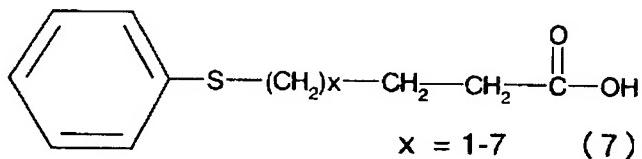
本発明のポリヒドロキシアルカノエートは、数平均分子量が 10000 から 3000 00 の範囲であるポリヒドロキシアルカノエートである。

【0029】

また、本発明の第二は、化学式(7)で示される化合物を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、発明の第一で示したポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0030】

【化33】



x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る

【0031】

更に本発明の第三は、化学式(7)で示される化合物及びポリペプトンを含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0032】

更に本発明の第四は、化学式(7)で示される化合物及び酵母エキスを含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0033】

更に本発明の第五は、化学式(7)で示される化合物及び糖類を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0034】

更に本発明の第六は、化学式(7)で示される化合物、及び有機酸或いはその塩を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0035】

更に本発明の第七は、化学式(7)で示される化合物、及びアミノ酸或いはその塩を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0036】

更に本発明の第八は、化学式(7)で示される化合物、及び炭素数4から12の直鎖アルカン酸或いはその塩を含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0037】

更に本発明の第九は、化学式(7)で示される化合物、及びポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物と有機酸或いはその塩とを含む培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0038】

更に本発明の第十は、化学式(7)で示される化合物、及びグルコースを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物とグルコースとを含む窒素源を含まない培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0039】

更に本発明の方法は、化学式(7)で示される化合物を含む培地中で培養した微生物細胞からポリヒドロキシアルカノエートを回収する工程を含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0040】

本発明の新規なポリヒドロキシアルカノエートは、モノマーユニットとなるヒドロキシアルカン酸がチオエーテル構造を有し、この構造により高い反応性を有している。このポリヒドロキシアルカノエートは、PHA生産能力を有する微生物により、該ヒドロキシアルカン酸と増殖用炭素源を含んだ培地から生産されるものである。

【0041】

【発明の実施の形態】

本発明の方法で用いる微生物は、化学式(7)で示される化合物を含む培地中で培養することにより「発明の第一」で述べたポリヒドロキシアルカノエートを生産しうる微生物であれば如何なる微生物であってもよいが、その一例としては、シードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物が挙げられる。さらに詳しくは、微生物がシードモナス・チコリアイ YN2株(*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シードモナス・チコリアイ H45株(*Pseudomonas cichorii* H45、FERM BP-7374)、シードモナス・ジェッセニイ P161株(*Pseudomonas jessenii* P161、FERM BP-7376)が挙げられる。これら3種の微生物は経済産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、特願平11-371863号に記載されている微生物である。

【0042】

以下にYN2株、H45株及びP161株についての詳細を示す。

<YN2株の菌学的性質>

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times 1.5\sim 2.0\mu\text{m}$

細胞の多形性 : なし

運動性 : あり

胞子形成 : なし

グラム染色性 : 陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、

表層なめらか、光沢、半透明

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	:陽性
オキシダーゼ	:陽性
O/F 試験	:酸化型(非発酵性)
硝酸塩の還元	:陰性
インドールの生成	:陽性
ブドウ糖酸性化	:陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	:陰性
ウレアーゼ	:陰性
エスクリン加水分解	:陰性
ゼラチン加水分解	:陰性
β -ガラクトシダーゼ	:陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性
4% NaClでの生育	:陽性(弱い生育)
ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	:陰性(*)
Tween80の加水分解	:陽性

* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

(3) 基質資化能

ブドウ糖	:陽性
L-アラビノース	:陽性
D-マンノース	:陰性
D-マンニトール	:陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	:陰性
マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性

dl-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性

< H45株の菌学的性質 >

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ	:桿菌、 $0.8\mu m \times 1.0 \sim 1.2\mu m$
細胞の多形性	:なし
運動性	:あり
胞子形成	:なし
グラム染色性	:陰性
コロニー形状	:円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、光沢、クリーム色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	:陽性
オキシダーゼ	:陽性
O/F 試験	:酸化型
硝酸塩の還元	:陰性
インドールの生成	:陰性
ブドウ糖酸性化	:陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	:陰性
ウレアーゼ	:陰性
エスクリン加水分解	:陰性
ゼラチン加水分解	:陰性
β -ガラクトシダーゼ	:陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性
4% NaClでの生育	:陰性
ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	:陰性

(3) 基質資化能

ブドウ糖	:陽性
L-アラビノース	:陰性
D-マンノース	:陽性
D-マンニトール	:陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	:陽性
マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性
dl-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性

< P 161株の菌学的性質 >

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ	:球状、 $\phi 0.6 \mu m$
	桿状、 $0.6 \mu m \times 1.5 \sim 2.0 \mu m$
細胞の多形性	:あり(伸長型)
運動性	:あり
胞子形成	:なし
グラム染色性	:陰性
コロニー形状	:円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、淡黄色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	:陽性
オキシダーゼ	:陽性

O/F 試験	:酸化型
硝酸塩の還元	:陽性
インドールの生成	:陰性
ブドウ糖酸性化	:陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	:陽性
ウレアーゼ	:陰性
エスクリン加水分解	:陰性
ゼラチン加水分解	:陰性
β -ガラクトシダーゼ	:陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性

(3) 基質資化能

ブドウ糖	:陽性
L-アラビノース	:陽性
D-マンノース	:陽性
D-マンニトール	:陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	:陽性
マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性
dL-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性

(培養工程)

本発明にかかるPHAの製造方法に用いる微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作成、PHAの生産に必要とされる菌数や活性状態を確保するための増殖などには、用いる微生物の増殖に必要な成分を含有する培地を適宜選択して用い

る。例えば、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地(肉汁培地、酵母エキスなど)や、栄養源を添加した合成培地など、いかなる種類の培地をも用いることができる。温度、通気、攪拌などの培養条件は、用いる微生物に応じて適宜選択する。

【0043】

前記したようなP H A生産微生物を用いて、目的とするポリヒドロキシアルカノエートを製造するためには、P H A生産用の原料として、該モノマーユニットに対応する、上記化学式(7)で示される化合物と、微生物の増殖用炭素源とを少なくとも含んだ無機培地などを用いることができる。上記化学式(7)で示される化合物は、培地あたり 0.01%から 1 % (w/v)、更に好ましくは 0.02%から 0.2 %の割合で含有していることが望ましい。

【0044】

水溶性は必ずしも良好ではないが、本発明に示す微生物を用いれば、懸濁された状態であっても何ら問題は無い。また、場合によっては1-ヘキサデセンやn-ヘキサデカンのような溶媒に溶解或いは懸濁された形で培地中に含有されることも可能である。この場合、該溶媒の濃度は培地溶液に対して3%以下にすることが必要である。

【0045】

増殖用炭素源としては、酵母エキスやポリペプトン、肉エキスといった栄養素を用いることが可能であり、更に、糖類、T C A回路中の中間体として生じる有機酸及びT C A回路から一段階ないしは二段階の生化学反応を経て生じる有機酸或いはその塩、アミノ酸或いはその塩、炭素数4から12の直鎖アルカン酸或いはその塩等から用いる菌株に対する基質としての有用性で適宜選択することができる。

【0046】

これらのうち、糖類としては、グリセロアルデヒド、エリスロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースといったアルドース、

グリセロール、エリスリトール、キシリトール等のアルジトール、

グルコン酸等のアルドン酸、
グルクロン酸、ガラクツロン酸等のウロン酸、
マルトース、スクロース、ラクトースといった二糖等
から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【0047】

また、有機酸或いはその塩としては、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸などがその例であり、或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【0048】

また、アミノ酸或いはその塩としては、グルタミン酸、アスパラギン酸或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【0049】

これらの中では、ポリペプトンや糖類を用いるのが好ましく、また糖類の中ではグルコース、フルクトース、マンノースからなる群から選択される少なくとも一つであることがより好ましい。これらの基質は通常培地あたり0.1%から5%(w/v)、更に好ましくは0.2%から2%の割合で含有していることが望ましい。

【0050】

微生物にPHAを生産・蓄積させる方法としては、一旦十分に増殖させて後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。具体的には、前記の工程を複数段接続した多段方式の採用が挙げられる。

【0051】

例えば、化学式(7)で示される化合物、及びポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、菌体を遠心分離等で回収したのち、これに続く、化学式(7)で示される化合物と有機酸或いはその塩とを含む(窒素源を含まない)培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なう方法、

あるいは、化学式(7)で示される化合物、及びグルコースを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、菌体を遠

心分離等で回収したのち、これに続く、化学式(7)で示される化合物とグルコースとを含む窒素源を含まない培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なう方法等である。

【0052】

培養温度としては上記の菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、例えば15～40℃、好ましくは20～35℃、更に好ましくは20℃から30℃程度が適当である。

【0053】

培養は液体培養、固体培養等該微生物が増殖し、PHAを生産する培養方法ならいかなる培養方法でも用いることができる。さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーファーメンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法がある。

【0054】

上記の培養方法に用いる無機培地としては、リン源(例えば、リン酸塩など)、窒素源(例えば、アンモニウム塩、硝酸塩など)等、当該微生物の増殖に必要な成分を含んでいるものであればいかなるものでも良く、例えば、MSB培地、M9培地等を挙げることができる。

【0055】

本発明の一方法に用いた無機塩培地(M9培地)の組成を以下に示す。

【0056】

[M9培地]

Na_2HPO_4 6.2g

KH_2PO_4 3.0g

NaCl 0.5g

NH_4Cl 1.0g

(培地1リットル中、pH 7.0)

更に、良好な増殖及びPHAの生産のためには、上記の無機塩培地に以下に示

す微量成分溶液を0.3% (v/v) 程度添加する必要がある。

【0057】

[微量成分溶液]

ニトリロ三酢酸:1.5; MgSO₄:3.0;
 MnSO₄:0.5; NaCl:1.0; FeSO₄:0.1;
 CaCl₂:0.1; CoCl₂:0.1; ZnSO₄:0.1;
 CuSO₄:0.1; AlK(SO₄)₂:0.1;
 H₃BO₃:0.1; Na₂MoO₄:0.1; NiCl₂:0.1

(培地1リットル中、pH7.0)

本発明にかかる培養液からのPHAの取得には、通常行なわれている方法を適用することができる。PHAが培養液中に分泌される場合は、培養液からの抽出精製方法が、また、菌体に蓄積される場合は、菌体からの抽出精製方法が用いられる。例えば、微生物の培養菌体からのPHAの回収には、通常行なわれているクロロホルムなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、クロロホルム以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、アセトンが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、EDTA等の薬剤による処理によってPHA以外の菌体成分を除去して、菌体内成分を除去することによってPHAのみを回収する方法を探ることもできる。

【0058】

なお、本発明の微生物の培養、本発明の微生物によるPHAの生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない。

【0059】

以下に実施例を示す。なお、以下における「%」は特に標記した以外は重量基準である。

【0060】

【実施例】

まず、5-チオフェノキシ吉草酸を含む培地でP H A生産菌を培養して3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸ユニットを主成分とするP H Aを製造した例を挙げる(実施例1～9)。

【0061】

[実施例1]

ポリペプトン 0.5%及び5-チオフェノキシ吉草酸 0.1%を含むM9培地 200mLに、寒天プレート状のY N 2株のコロニーを植菌し、500mL容振とうフラスコで 30°C、30時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を収穫し、メタノールで洗浄した後凍結乾燥した。乾燥菌体を秤量後、アセトンを加え、室温(約 23°C)で 72時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたアセトンをろ過し、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は 215mg、得られたポリマーの重量は 76mgであった。

【0062】

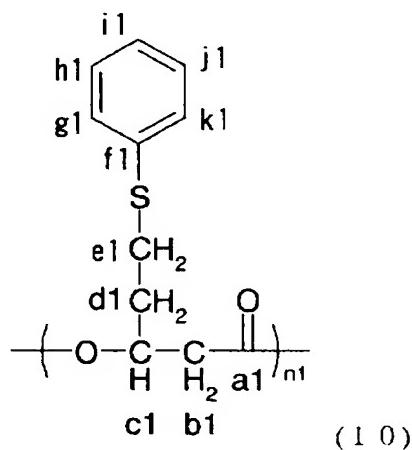
得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)により測定した(東ソー HLC-8220 GPC、カラム:東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算)。その結果、得られたポリマーはM_n=150000,M_w=390000 であった。

【0063】

得られたポリマーの構造決定は、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR によって行った(FT-NMR:Bruker DPX400; ¹H共鳴周波数:400MHz; 測定核種:¹H 及び ¹³C; 使用溶媒:CDCl₃; reference:キャピラリ封入TMS/CDCl₃; 測定温度:室温)。¹H-NMR 及び ¹³C-NMRスペクトルチャートをそれぞれ図1及び図2に示す。また、下記式(10)に示す各H及びC原子の帰属を、表1(¹H-NMR)及び表2(¹³C-NMR)に示す。

【0064】

【化34】



【0065】

【表1】

表1 $^1\text{H-NMR}$ 帰属結果

ppm	積分値	分裂	帰属
1.89	2H	m	d1
2.41~2.56	2H	m	b1
2.80~2.91	2H	m	e1
5.25	1H	m	c1
7.12	1H	m	i1
7.20~7.46	4H	m	g1,h1,j1,k1

【0066】

【表2】

表2 $^{13}\text{C-NMR}$ 帰属結果

ppm	分裂	帰属
29.1	s	e1
33.2	s	d1
38.7	s	b1
69.6	s	c1
126.1	s	i1
128.8	s	h1,j1
129.1	s	g1,k1
135.8	s	f1
168.9	s	a1

【0067】

¹H-NMRの帰属の結果、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸ユニットは全体の少なくとも 93%以上は導入されていることが示された。

【0068】

[実施例2]

グルコース 0.5%及び5-チオフェノキシ吉草酸 0.05%を含むM9培地 200mLに、寒天プレート状のYN2株のコロニーを植菌し、500mL容振とうフラスコで 30°C、45時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を収穫し、NH₄Cl成分を含まないM9培地に、グルコース 0.5%及び5-チオフェノキシ吉草酸 0.05%を加えて調製した培地に菌体を移し、30°C、48時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を収穫し、メタノールで洗浄した後凍結乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、60°Cで 24時間ポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は 400mg、得られたポリマーの重量は 220mgであった。

【0069】

得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)により測定した(東ソー HLC-8220 GPC、カラム:東ソー TSK-GEL SuperHM-H、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算)。その結果、Mn=170000, Mw=560000 であった。

【0070】

得られたポリマーの構造決定は、¹H-NMRによって行った(FT-NMR: Bruker DPX400; ¹H共鳴周波数: 400MHz; 測定核種: ¹H; 使用溶媒: CDCl₃; reference: キャピラリ封入TMS/CDCl₃; 測定温度: 室温)。その結果、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸ユニットは全体の少なくとも 84%以上は導入されていることが示された。

【0071】

[実施例3]

菌株をH45株とした以外は実施例1と同様の方法でポリマーを得た。乾燥菌体

の重量は 180mg、得られたポリマーの重量は 78mgであった。得られたポリマー 10mgを 2 mLのクロロホルムに溶解し、3 %硫酸を含むメタノール 2 mLを加えて 100°Cで 3 時間半還流することによりポリマーのメチル化分解を行った。反応後、蒸留水を加えて攪拌し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水した後、ガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS; Shimadzu QP-5050A; カラム: DB-WAXE TR (J&W); カラム温度: 80°C → 昇温 5°C/分 → 200°C; 注入及びインターフェース温度: 230°C)で分析を行った。結果(トータルイオンクロマト(TIC)及びマススペクトル)を図3に示す。85分付近のピークのマススペクトルより、本ピークが3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルであることが確認された。ポリヒドロキシアルカノエートのモノマーユニット由来のピークはこれ以外に 11分付近の3-ヒドロキシ吉草酸メチルエステルのみであり、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルの割合は約 97%であった。

【0072】

[実施例4]

菌株を P161株とした以外は実施例1と同様の方法でポリマーを得た。乾燥菌体の重量は 160mg、得られたポリマーの重量は 69mgであった。得られたポリマー 10mgを 2 mLのクロロホルムに溶解し、3 %硫酸を含むメタノール 2 mLを加えて 100°Cで 3 時間半還流することによりポリマーのメチル化分解を行った。反応後、蒸留水を加えて攪拌し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水した後、ガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS; Shimadzu QP-5050A; カラム: DB-WAXE TR (J&W); カラム温度: 80°C → 昇温 5°C/分 → 200°C; 注入及びインターフェース温度: 230°C)で分析を行った。結果(トータルイオンクロマト(TIC)及びマススペクトル)を図3に示す。85分付近のピークのマススペクトルより、本ピークが3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルであることが確認された。ポリヒドロキシアルカノエートのモノマーユニット由来のピークはこれ以外に 11分付近の3-ヒドロキシ吉草酸メチルエステルのみであり、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルの割合は約 95%であった。

【0073】

[実施例5]

グリセロール 0.5%及び5-チオフェノキシ吉草酸 0.1%を含むM9培地 200 mLに、予めポリペプトン 0.5%を含むM9培地で 20時間培養したYN2株の培養液を 1 mL加え、500 mL容振とうフラスコで 30°C、24時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を収穫し、NH₄Cl成分を含まないM9培地に、グリセロール 0.5%及び5-チオフェノキシ吉草酸 0.1%を加えて調製した培地に菌体を移し、30°C、23時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を収穫し、メタノールで洗浄した後凍結乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、60°Cで 24時間ポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバボレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は 267 mg、得られたポリマーの重量は 191 mgであった。

【0074】

得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)により測定した(東ソー HLC-8220 GPC、カラム:東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算)。その結果、M_n=80000, M_w=220000 であった。

【0075】

得られたポリマー 10 mgを 2 mLのクロロホルムに溶解し、3 %硫酸を含むメタノール 2 mLを加えて 100°Cで 3 時間半還流することによりポリマーのメチル化分解を行った。反応後、蒸留水を加えて攪拌し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水した後、ガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS; Shimadzu QP-5050A; カラム: DB-WAX E T R (J&W); カラム温度: 80°C→昇温 5°C /分→200°C:注入及びインターフェース温度: 230°C)で分析を行った。結果(トータルイオンクロマト(TIC)及びマススペクトル)を図5に示す。85分付近のピークのマススペクトルより、本ピークが3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルであることが確認された。それ以外のユニットである3-ヒドロキシアルカン酸メチルエステルを含め、TICのピーク面積より求めた割合を表

3に示す。

【0076】

【表3】

表3

3-ヒドロキシ酪酸(%)	0.5
3-ヒドロキシヘキサン酸(%)	0.1
3-ヒドロキシオクタン酸(%)	1.1
3-ヒドロキシデカン酸(%)	2.1
3-ヒドロキシウンデカン酸(%)	0.4
3-ヒドロキシウンデセン酸(%)	0.9
3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸(%)	94.9

【0077】

[実施例6]

実施例5のグリセロールの代わりにリンゴ酸ナトリウムを用い、実施例5と同様の方法で目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は 298mg、得られたポリマーの重量は 215mgであった。

【0078】

得られたポリマーの分子量は、同様にGPCにより測定した。その結果、 $M_n = 180000, M_w = 550000$ であった。得られたポリマーを実施例5と同様の方法で更に同様にGC-MS分析を行った。結果(トータルイオンクロマト(TIC)及びマススペクトル)を図6に示す。85分付近のピークのマススペクトルより、本ピークが3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルであることが確認された。それ以外のユニットである3-ヒドロキシアルカン酸メチルエステルを含め、TICのピーク面積より求めた割合を表4に示す。

【0079】

【表4】

表4

3-ヒドロキシ酪酸(%)	0.1
3-ヒドロキシヘキサン酸(%)	0.2
3-ヒドロキシオクタン酸(%)	1.8
3-ヒドロキシデカン酸(%)	3.9
3-ヒドロキシウンデカン酸(%)	1.3
3-ヒドロキシウンデセン酸(%)	1.7
3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸(%)	91.0

【0080】

[実施例7]

実施例5のグリセロールの代わりに乳酸ナトリウムを用い、実施例5と同様の方法で目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は 430mg、得られたポリマーの重量は 298mg であった。

【0081】

得られたポリマーの分子量は、同様に GPC により測定した。その結果、 $M_n = 130000, M_w = 430000$ であった。

【0082】

得られたポリマーを実施例5と同様の方法で更に同様に GC-MS 分析を行った。結果(トータルイオンクロマト(TIC)及びマススペクトル)を図7に示す。8.5分付近のピークのマススペクトルより、本ピークが 3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルであることが確認された。それ以外のユニットである 3-ヒドロキシアルカン酸メチルエステルを含め、TIC のピーク面積より求めた割合を表5に示す。

【0083】

【表5】

表5

3-ヒドロキシ酪酸(%)	0.8
3-ヒドロキシヘキサン酸(%)	0.2
3-ヒドロキシオクタン酸(%)	2.1
3-ヒドロキシデカン酸(%)	5.7
3-ヒドロキシウンデカン酸(%)	2.3
3-ヒドロキシウンデセン酸(%)	3.1
3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸(%)	85.8

【0084】

[実施例8]

酵母エキス(Dfico社)0.5%及び5-チオフェノキシ吉草酸 0.1%を含むM9培地 200mLに、寒天プレート状のYN2株のコロニーを植菌し、500mL容振とうフラスコで 30°C、21時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を収穫し、メタノールで洗浄した後凍結乾燥した。乾燥菌体を秤量後、アセトンを加え、室温(約 23°C)で 72時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたアセトンをろ過し、エバボレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は 255mg、得られたポリマーの重量は 40mgであった。

GPC測定結果より得られたポリマーの分子量は、 $M_n=61000, M_w=110000$ であった。

【0085】

得られたポリマーを実施例5と同様の方法で更に同様にGC-MS分析を行った。結果(トータルイオンクロマト(TIC)及びマススペクトル)を図8に示す。8.5分付近のピークのマススペクトルより、本ピークが3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルであることが確認された。それ以外のユニットは2.5分付近の3-ヒドロキシデカン酸メチルエステルのみであり、割合も 0.1%以下であった。このことより、本ポリマーは 99.9%以上3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸ユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートであることが示さ

れた。

【0086】

[実施例9]

菌株をYN2株からH45株に変更した以外は実施例8と同様の操作を行い、ポリマーを得た。乾燥菌体の重量は177mg、得られたポリマーの重量は39mgであった。

【0087】

GPC測定結果より得られたポリマーの分子量は、 $M_n=67000, M_w=120000$ であった。

【0088】

得られたポリマーを実施例5と同様の方法で更に同様にGC-MS分析を行った。結果(トータルイオンクロマト(TIC)及びマススペクトル)を図9に示す。85分付近のピークのマススペクトルより、本ピークが3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸メチルエステルであることが確認された。それ以外のユニットは25分付近の3-ヒドロキシデカン酸メチルエステルのみであり、割合も0.1%以下であった。このことより、本ポリマーは99.9%以上3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸ユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートであることが示された。

【0089】

次に、4-チオフェノキシ酪酸(以下、TPxB Aと略する場合もある)を含む培地でPHA生産菌を培養して3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸(以下、3HTPx Bと略する場合もある)ユニットを主成分とするPHAを製造した例を挙げる(実施例10~19)。

【0090】

[実施例10]

D-グルコース0.5%、TPxB A 0.1%とを含むM9培地200mLに、シードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。50時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、TPxB A 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、

更に、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0091】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで 20時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 52mg 得た。得られた P H A は、以下の条件で N M R 分析を行った。

<測定機器> F T - N M R : Brucker D P X 400

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400\text{MHz}$, $^{13}\text{C} = 100\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H , ^{13}C

使用溶媒: CDCl₃

測定温度: 室温

^1H -NMR, ^{13}C -NMR スペクトルチャートをそれぞれ図10、図11に、その同定結果を表6、表7にそれぞれ示す。

【0092】

【表6】

表6

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
2.59	2	m	c1
3.08	2	m	b1
5.22	2	quint	d1
7.15	1	t	h1
7.24	2	t	g1&i1
7.34	2	d	f1&j1

【0093】

【表7】

表7

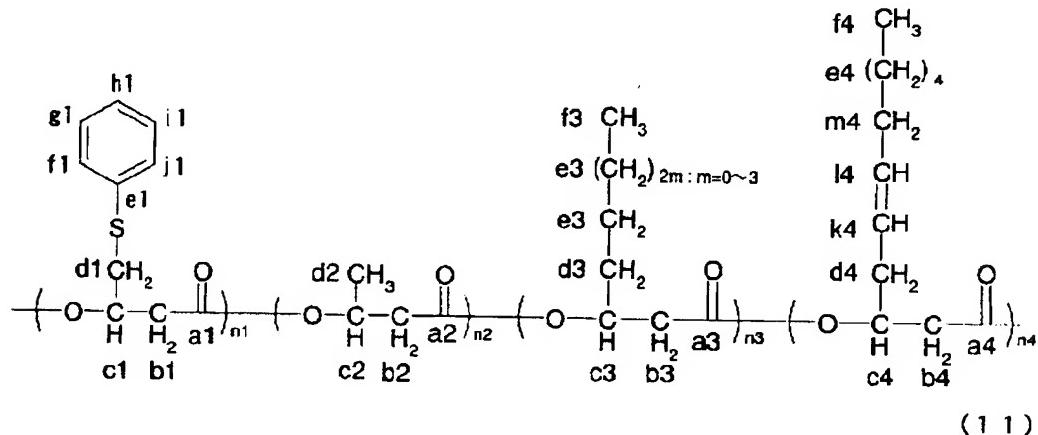
Chemical shift (ppm)	分裂	同定結果
36.6	s	b1 or c1
37.3	s	b1 or c1
69.4	s	d1
126.5	s	h1
129.0	s	f1&j1
129.6	s	g1&i1
135.1	s	e1
168.7	s	a1

【0094】

表6及び表7に示す通り、当該PHAは3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酸をモノマーユニットとして含む、下記式(11)で表されるPHAであることが確認された。

【0095】

【化35】



【0096】

また、得られたPHAの分子量をゲルパーキエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8220、カラム; 東ソー TSK-GEL SuperHM-H、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した結果、M_n=25100、M_w=53100であった。

【0097】

[実施例11]

D-グルコース 0.5%、TPxB A 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。50時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、TPxB A 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0098】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 25mg得た。得られたPHAは、実施例10と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを 87.3mol%含むことがわかった。

【0099】

[実施例12]

D-グルコース 0.5%、TPxB A 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。50時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、TPxB A 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0100】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 25mg得た。得られたPHAは

、実施例10と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを85.6mol%含むことがわかった。

【0101】

[実施例13]

ポリペプトン0.5%、TPxB A 0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム0.5%、TPxB A 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0102】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを118mg得た。得られたPHAは、実施例10と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを92.6mol%含むことがわかった。

【0103】

[実施例14]

ポリペプトン0.5%、TPxB A 0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム0.5%、FTPxBA 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0104】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで20時間攪拌し

てP H Aを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu m$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してP H Aを24mg得た。

【0105】

得られたP H Aは、実施例10と同様の条件でN M R分析を行った結果、得られたP H Aは、3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを91.2mol%含むことがわかった。

【0106】

[実施例15]

ポリペプトン0.5%、T P x B A 0.1%とを含むM 9培地200mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P 161株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム0.5%、F T P x B A 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM 9培地200mLに再懸濁して、更に、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0107】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで20時間攪拌してP H Aを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu m$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してP H Aを40mg得た。

【0108】

得られたP H Aは、実施例10と同様の条件でN M R分析を行った結果、得られたP H Aは、3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを89.3mol%含むことがわかった。

【0109】

[実施例16]

グルタミン酸ナトリウム0.5%、T P x B A 0.1%とを含むM 9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度

洗浄して凍結乾燥した。

【0110】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで 20時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 41mg 得た。

【0111】

得られた PHA は、実施例 10 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを 94.5 mol% 含むことがわかった。

【0112】

[実施例 17]

酵母エキス 0.5%、TPxB A 0.1% とを含む M9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・YN2 株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0113】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで 20時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 9mg 得た。

【0114】

得られた PHA は、実施例 10 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、NMR より 3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを 82.6 mol% 含むことがわかった。

【0115】

[実施例 18]

n-ノナン酸 0.1%、TPxB A 0.1% とを含む M9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・YN2 株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した

。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0116】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで 20時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 40mg 得た。

【0117】

得られた PHA は、実施例 10 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、NMR より 3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを 7.0mol% 含むことがわかった。

【0118】

[実施例 19]

n-オクタン酸 0.1%、TPxB A 0.1% とを含む M9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・YN2 株を植菌し、30°C、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0119】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60°Cで 20時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 35mg 得た。

【0120】

得られた PHA は、実施例 10 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、NMR より 3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸のモノマーユニットを 8.0mol% 含むことがわかった。

【0121】

表 8 は、実施例 10 ~ 19 における菌体乾燥重量、ポリマー乾燥重量、ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量及び得られたポリマーの 3HTPx B ユニットの mol%

を示したものである。

【0122】

【表8】

表8

	乾燥菌体重量 (mg/L)	乾燥ポリマー 重量(mg/L)	菌体重量/ポリマー重量 (%)	3HTPxR ユニット mol%
実施例 10	695	260	37.4	92.1
実施例 11	495	125	25.3	87.3
実施例 12	725	250	34.5	85.6
実施例 13	1160	590	50.9	92.6
実施例 14	550	120	21.8	91.2
実施例 15	540	110	20.4	89.3
実施例 16	650	205	31.5	94.5
実施例 17	860	45	5.2	82.6
実施例 18	425	200	47.1	7.0
実施例 19	405	175	43.2	8.0

【0123】

【発明の効果】

本発明により、側鎖にチオフェノキシ構造を有するユニット、例えば3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸をモノマーユニットとして含む新規ポリヒドロキシアルカノエートと、チオフェノキシ構造を有するユニットとしては3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸ユニットのみを含むポリヒドロキシアルカノエートが提供される。また、これらのポリヒドロキシアルカノエートを微生物生産を用いて生産する方法が提供される。

【0124】

これにより、機能性ポリマーとして有用なポリヒドロキシアルカノエートが効率的に生産でき、デバイス材料や医薬材料等の各分野への応用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例1で得られたポリマーの¹H-NMRスペクトルを示す。

【図2】

実施例1で得られたポリマーの¹³C-NMRスペクトルを示す。

【図3】

実施例3で得られたポリマーのメチル化分解物のGC-M Sチャートを示す。

【図4】

実施例4で得られたポリマーのメチル化分解物のGC-M Sチャートを示す。

【図5】

実施例5で得られたポリマーのメチル化分解物のGC-M Sチャートを示す。

【図6】

実施例6で得られたポリマーのメチル化分解物のGC-M Sチャートを示す。

【図7】

実施例7で得られたポリマーのメチル化分解物のGC-M Sチャートを示す。

【図8】

実施例8で得られたポリマーのメチル化分解物のGC-M Sチャートを示す。

【図9】

実施例9で得られたポリマーのメチル化分解物のGC-M Sチャートを示す。

【図10】

実施例10で得られたポリマーの¹H-NMRスペクトルを示す。

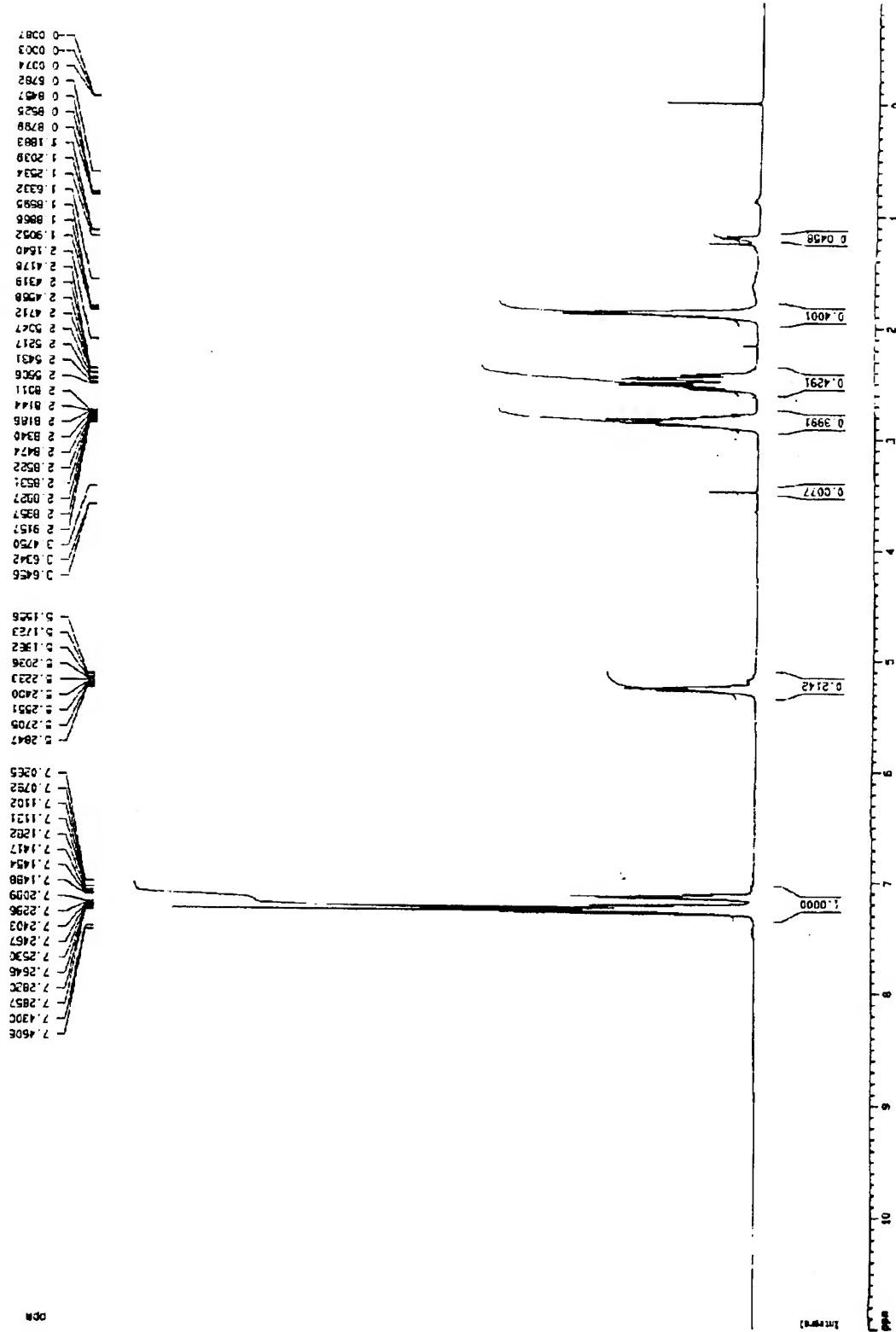
【図11】

実施例10で得られたポリマーの¹³C-NMRスペクトルを示す。

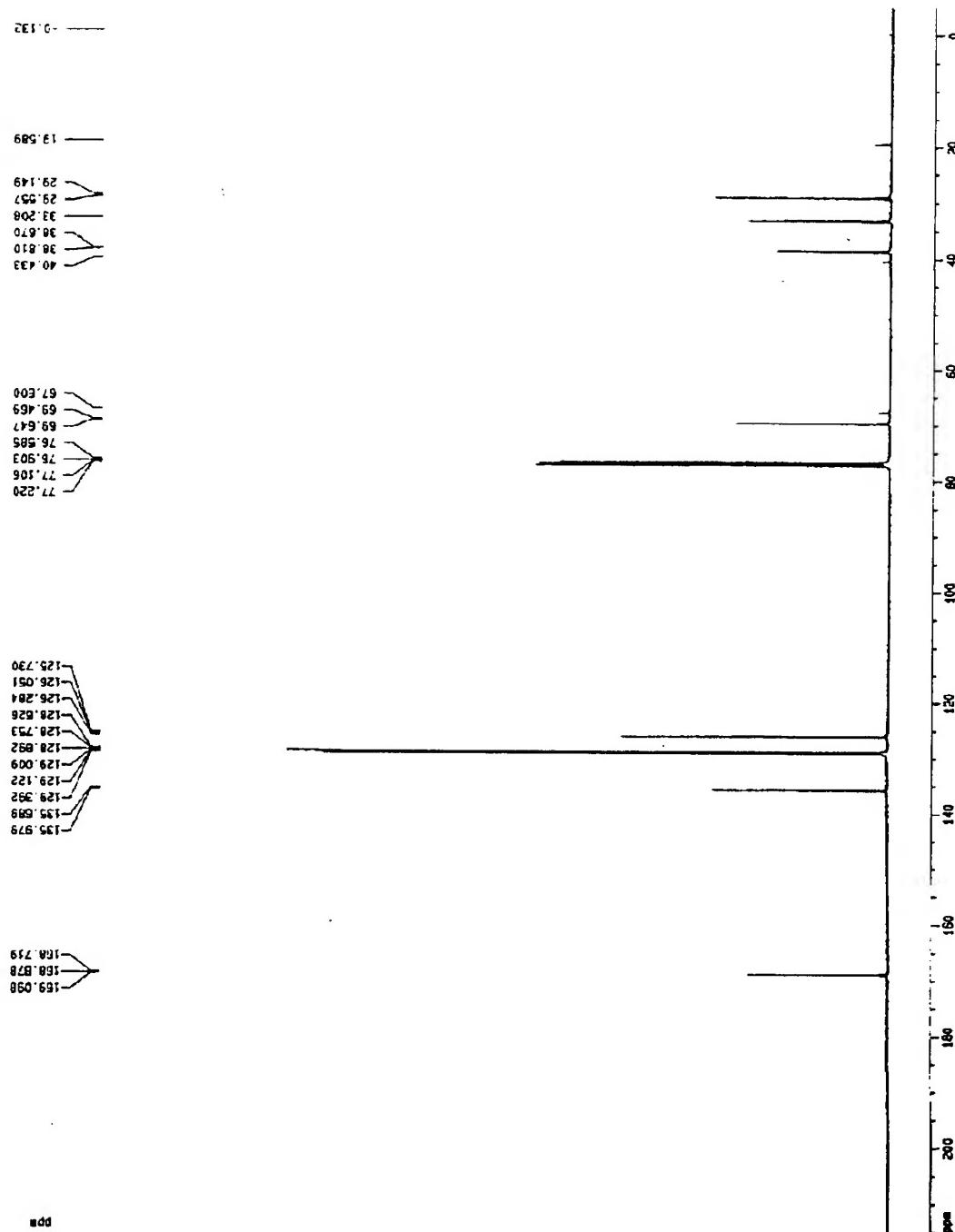
【書類名】

四面

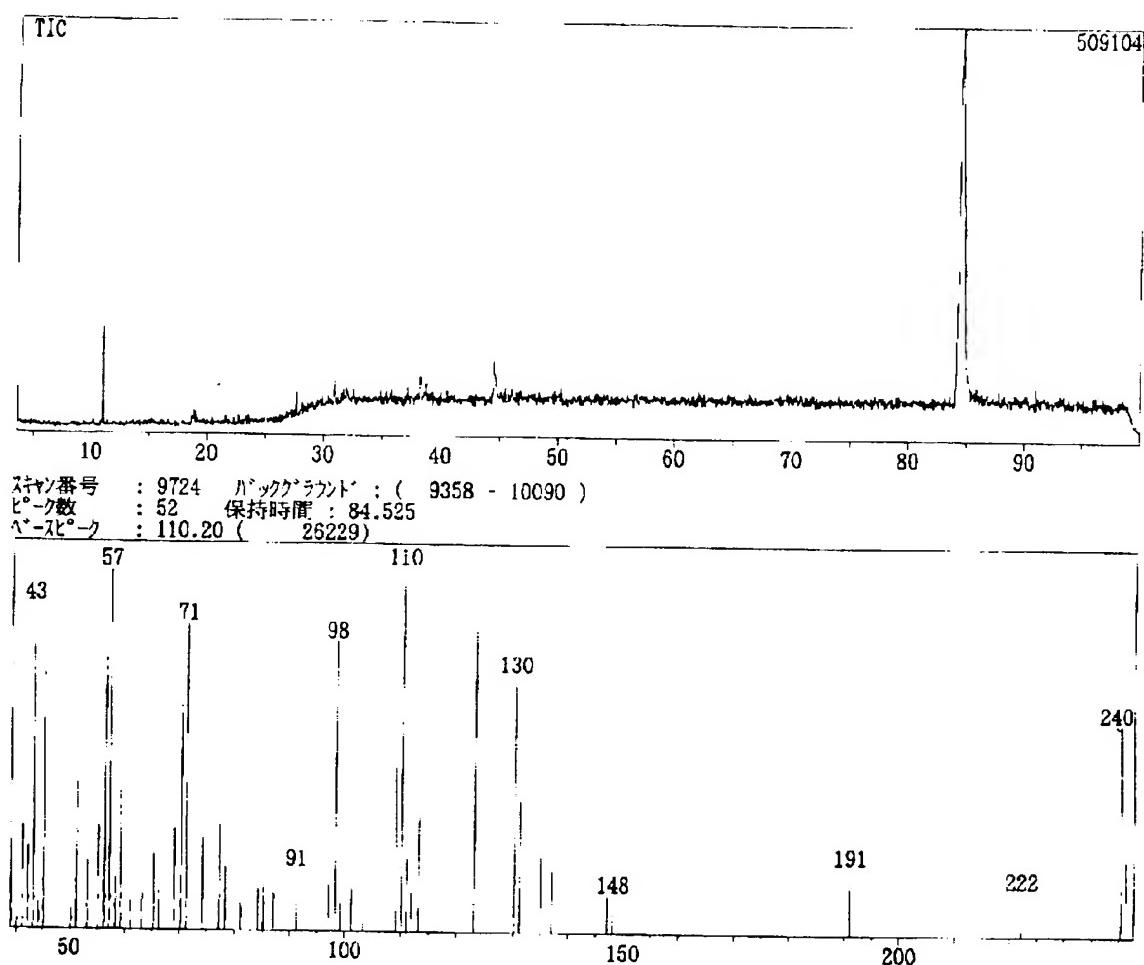
【図1】



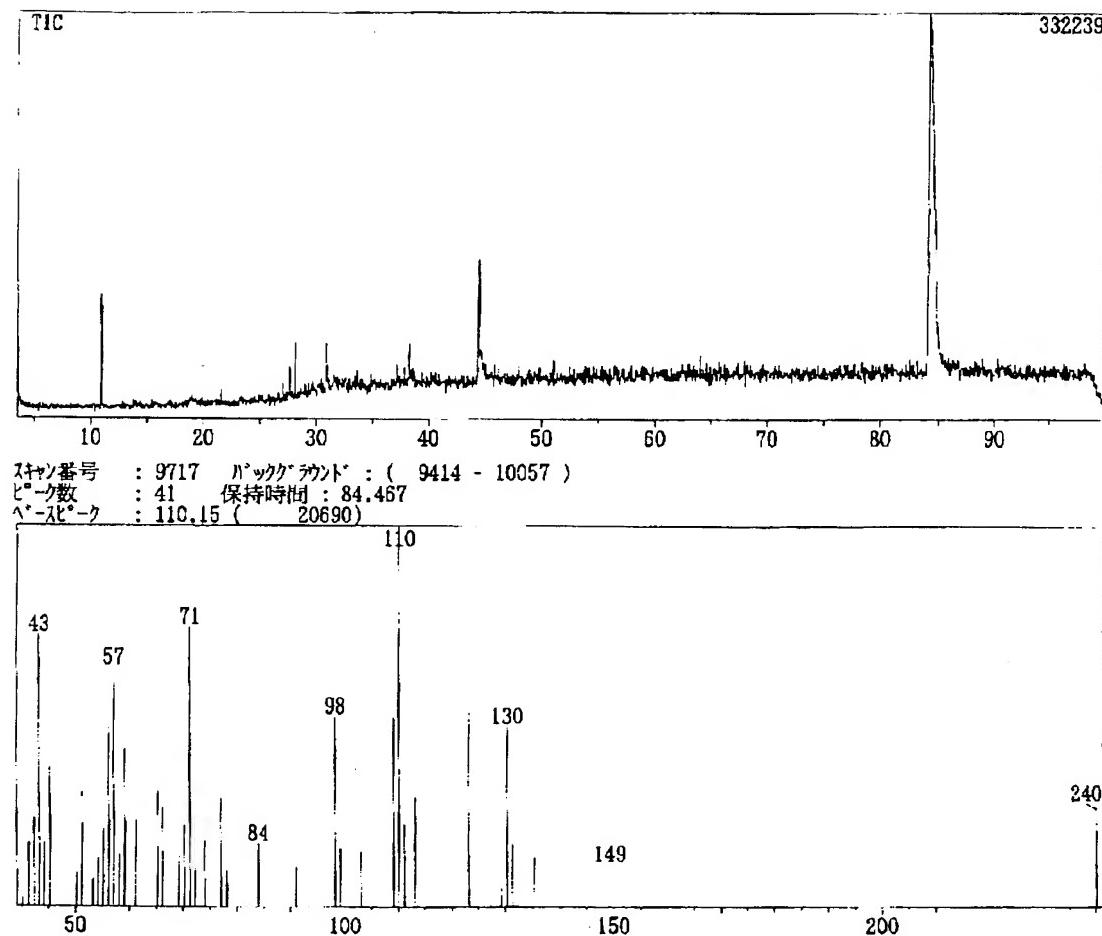
【図2】



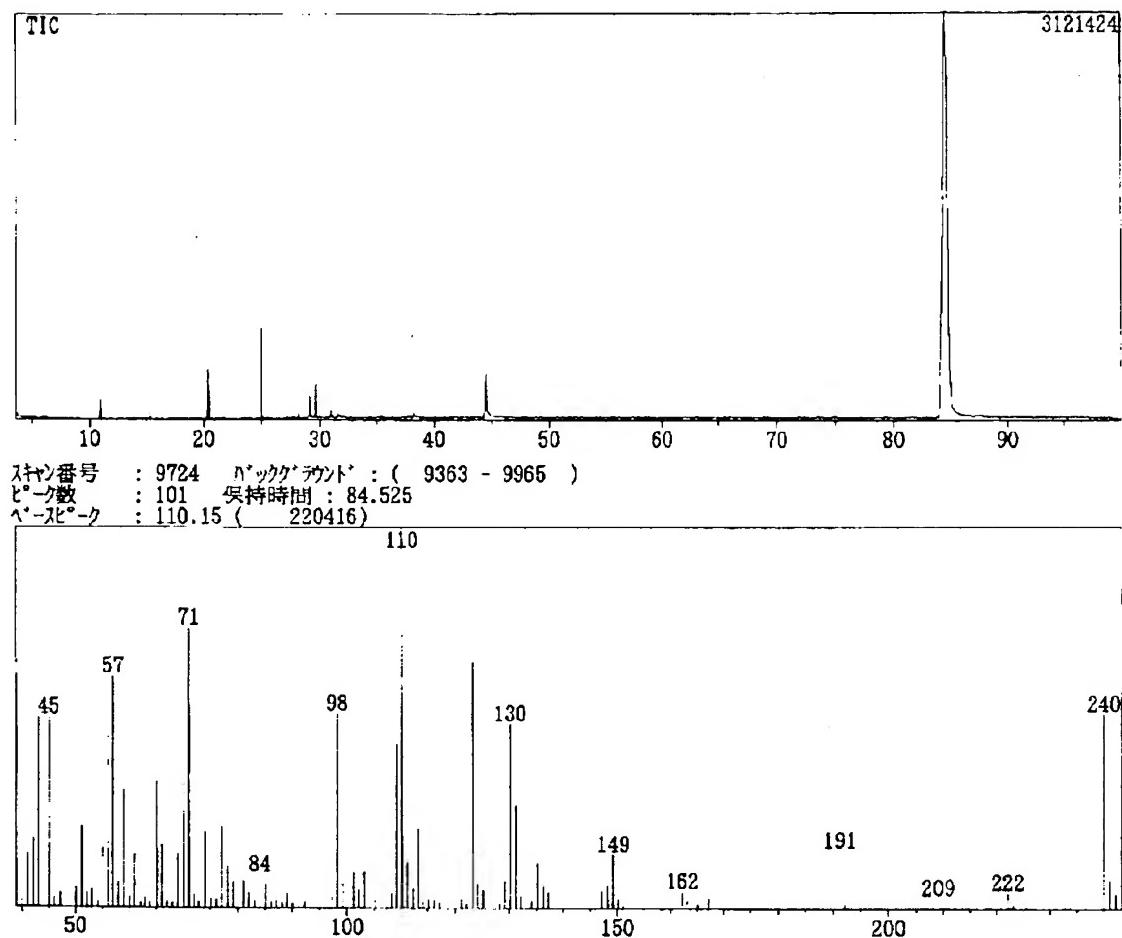
【図3】



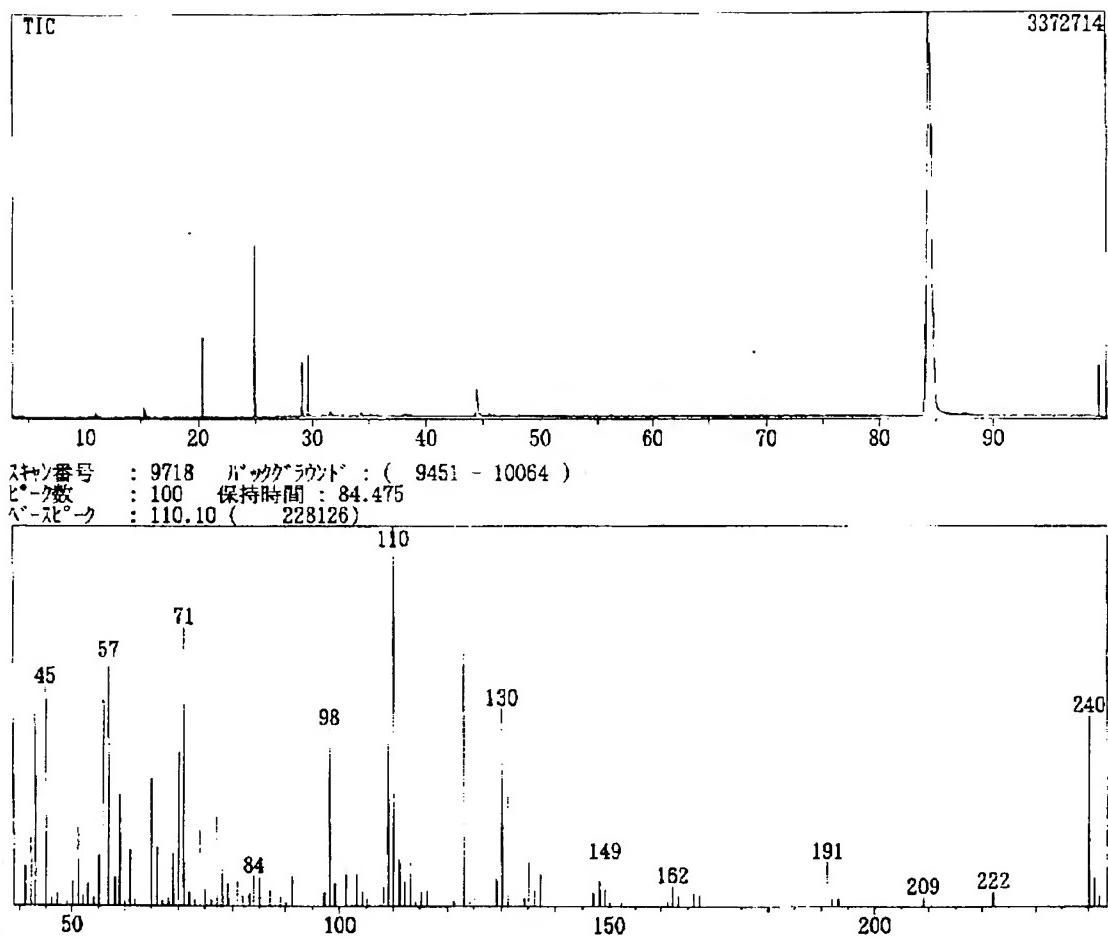
【図4】



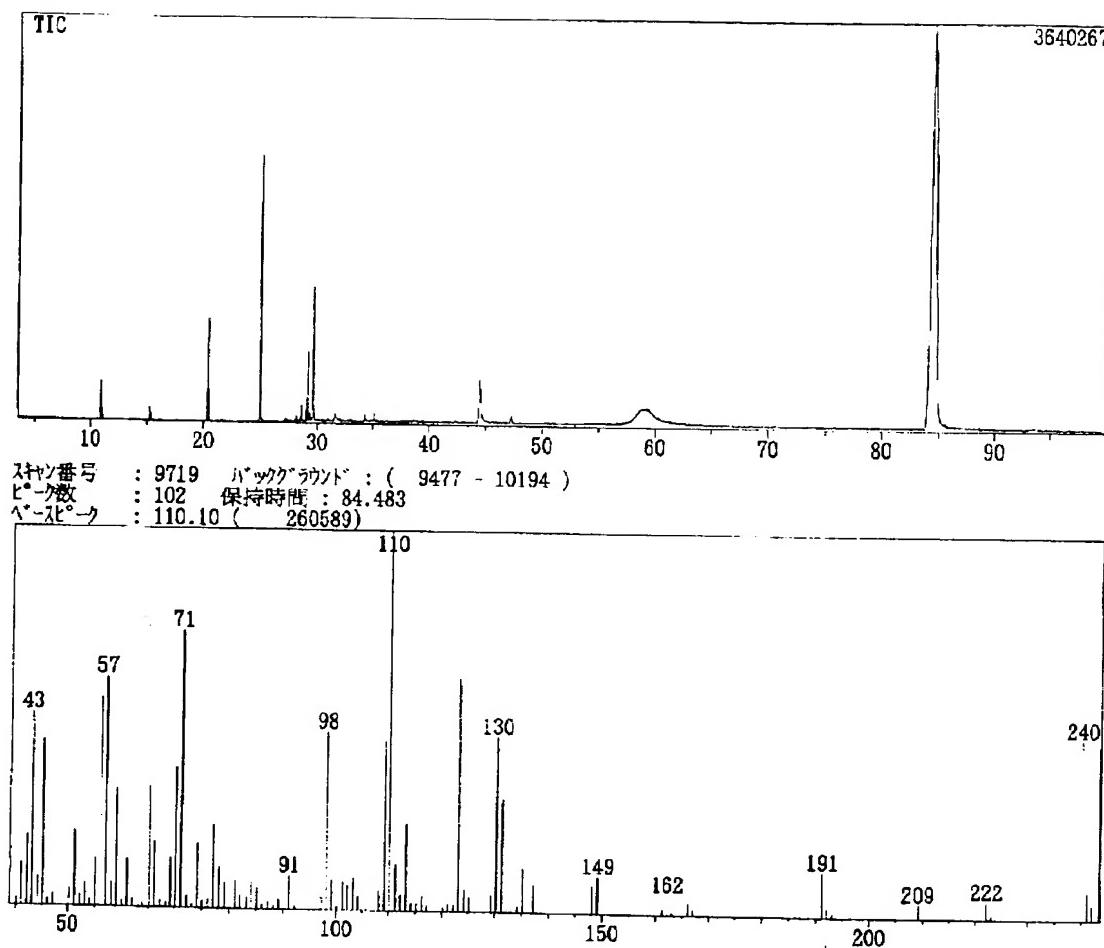
【図5】



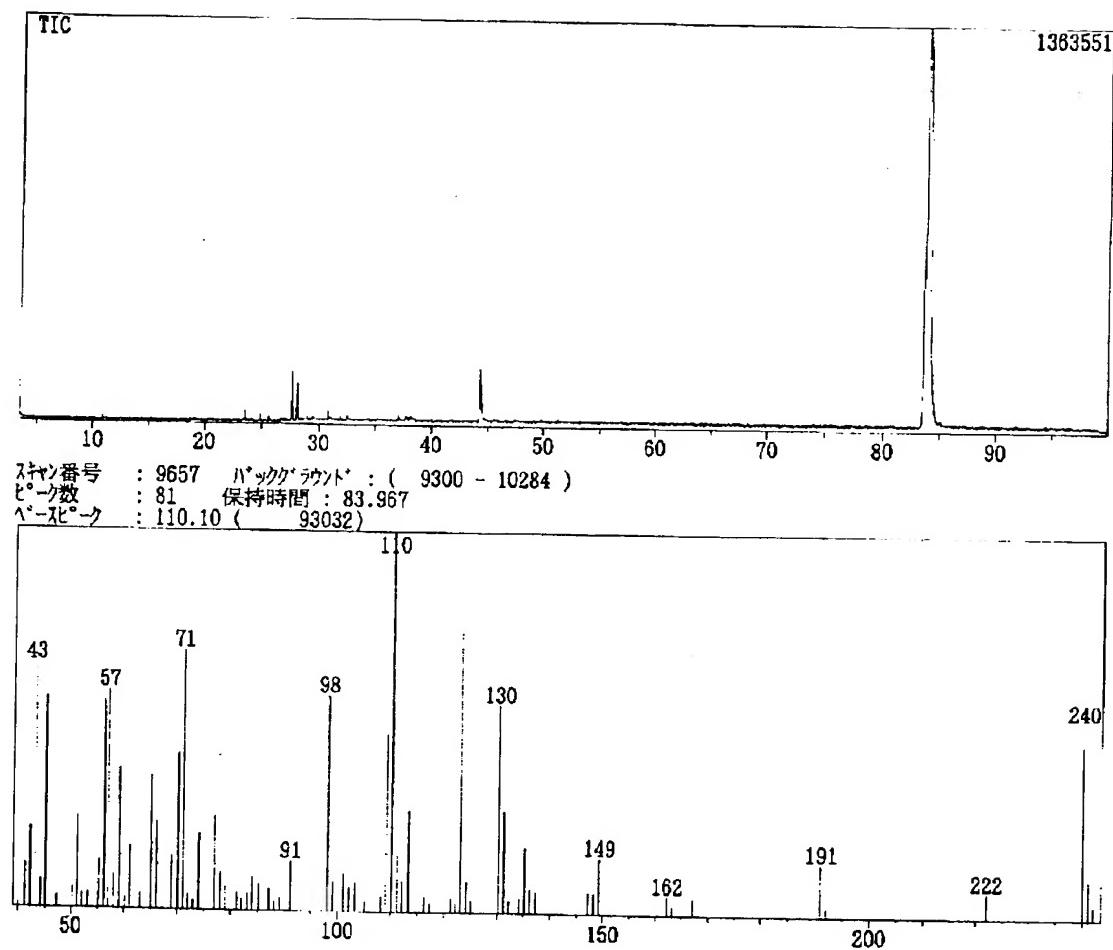
【図6】



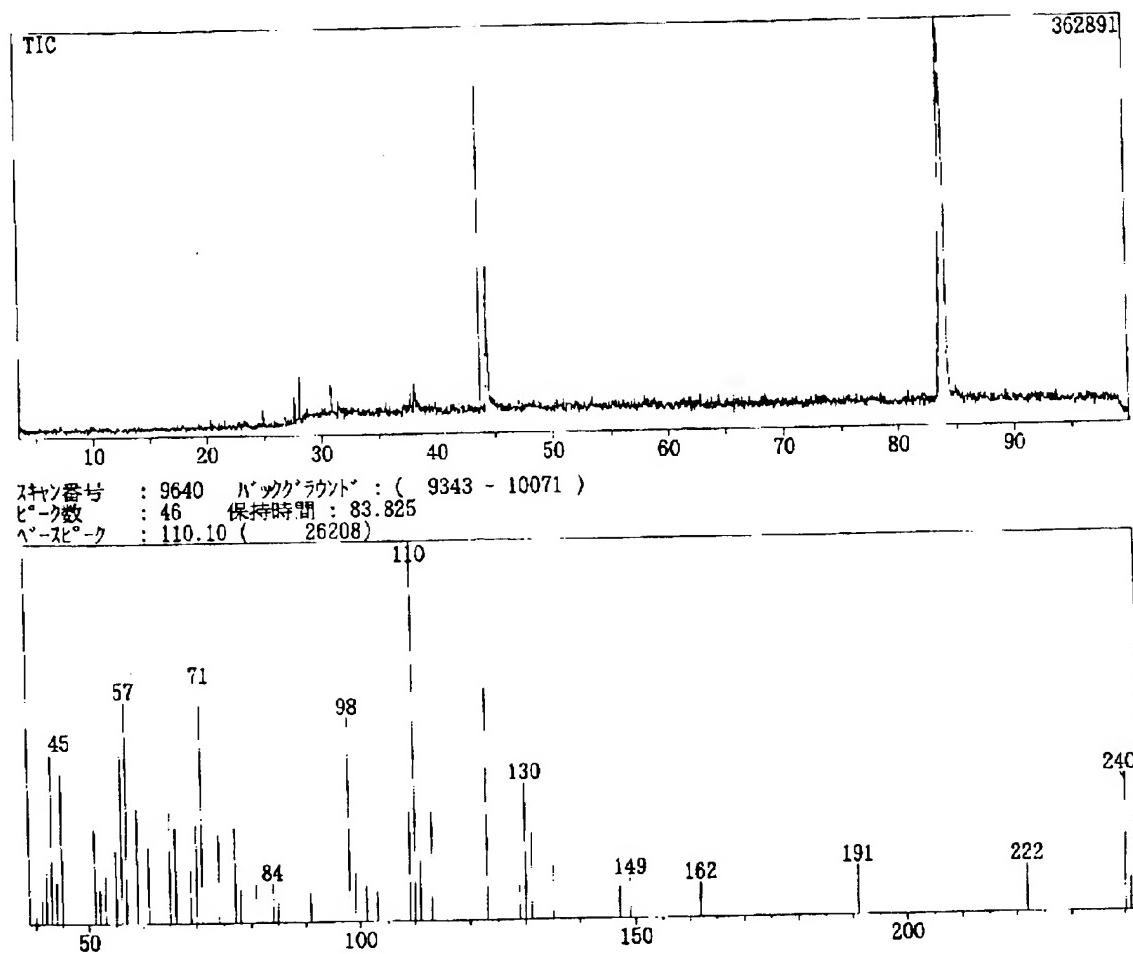
【図7】



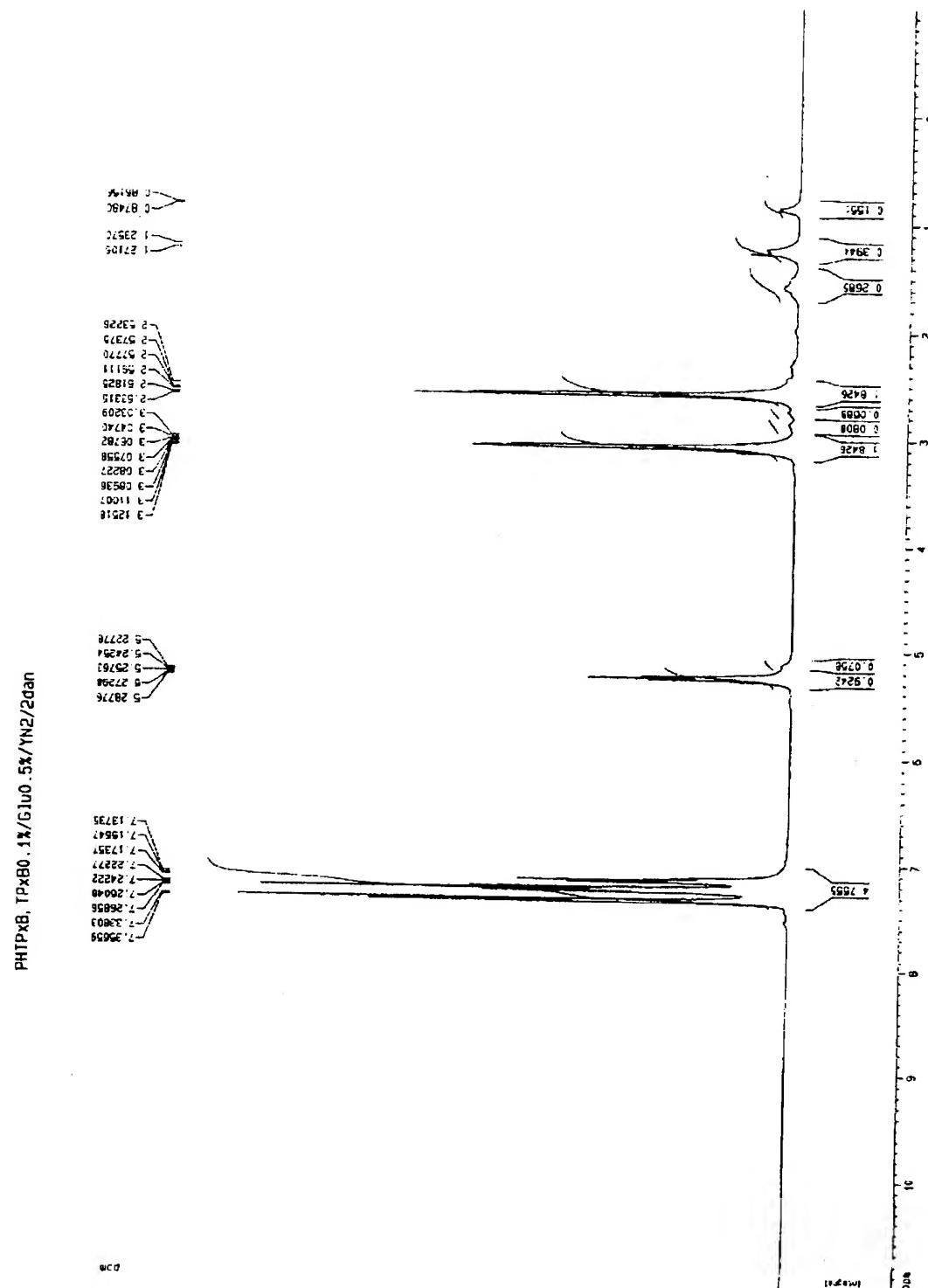
【図8】



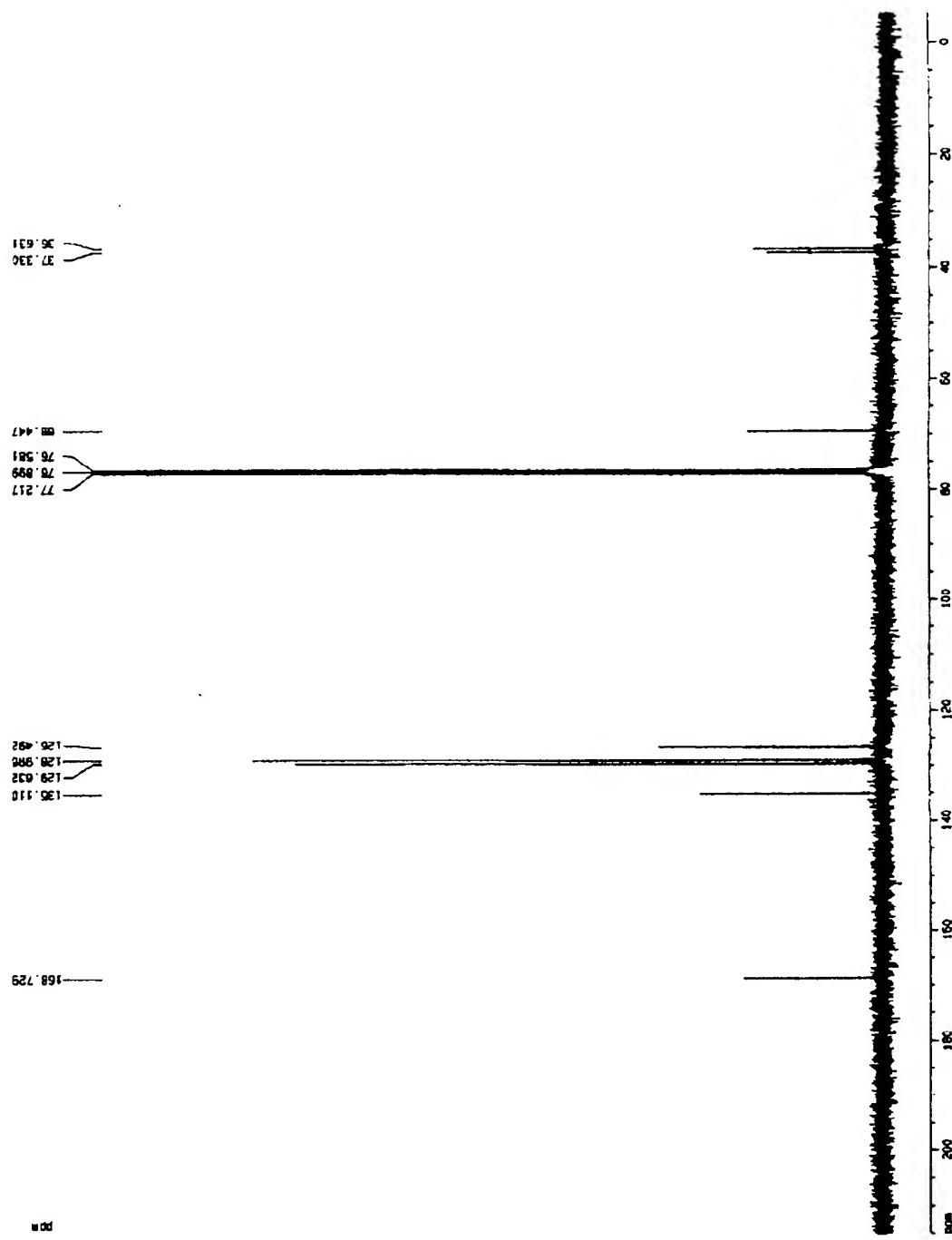
【図9】



【図10】



【図11】



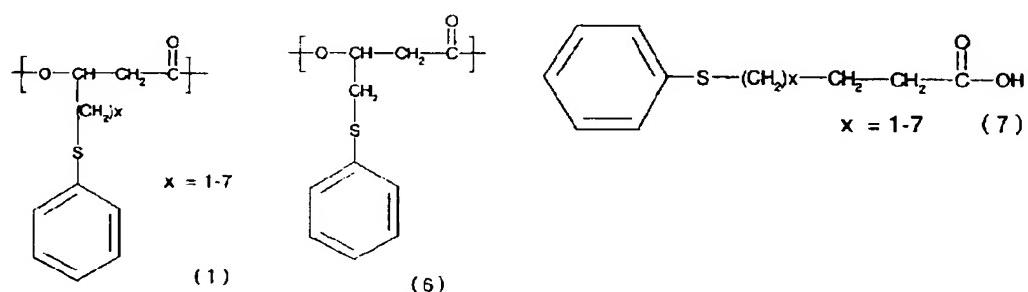
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な、側鎖にチオエーテル構造を有するユニットを含む新規なPHAおよびその製造方法を提供する。

【解決手段】 下記化学式(1)で示すユニットを含むPHA。特に、化学式(6)で表される3-ヒドロキシ-4-チオフェノキシ酪酸をモノマーユニットとして含む新規なPHA、さらに化学式(7)で示される化合物を含む培地中で培養した微生物細胞からPHAを回収する工程を含むPHAの製造方法。

【化 1】



(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名 キヤノン株式会社